

Aus dem Institut für Angewandte Physiologische Chemie und Klinische Chemie
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Joachim Dulce

AUSSCHIEDUNGSPRODUKTE VON OXYANTHRACHINONEN UND IHR
EINFLUß AUF DIE KRISTALLISATION VON CALCIUMOXALAT

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bernhard Mähner

aus Berlin

1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533915_0114

Aus dem Institut für Angewandte Physiologische Chemie
und Klinische Chemie der Freien Universität Berlin

Direktor : Professor Dr. med Hans-Joachim D u l c e

Ausscheidungsprodukte von Oxyanthrachinonen und ihr
Einfluß auf die Kristallisation von Calciumoxalat.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernhard Wähner
aus Berlin

Dekan : Professor Dr. med Hans Wolfgang S p i e r

Referent : Professor Dr. med Hans-Joachim D u l c e

Korreferent : Professor Dr. med Wolfgang K o r a n s k y



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 17. November 1967

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	Seite	3
Versuchsordnung	Seite	5
I. Isolierung der im Harn aus- schiedenen Oxyanthrachinone	Seite	5
II. Identitätsnachweise	Seite	5
1) Spaltung mit -Glucurodase	Seite	5
2) Absorptionsspektren der Oxyanthrachinone	Seite	6
3) Chromatogramme	Seite	6
III. Ausscheidungsversuch	Seite	6
IV. Kristallisationsversuch	Seite	7
Ergebnisse	Seite	8
I.	Seite	8
II. 1, 2, 3,	Seite	9
III.	Seite	16
IV.	Seite	16
Diskussion	Seite	20
Zusammenfassung	Seite	24
Methodik	Seite	25
Glucuronsäureeichkurve	Seite	25
Alizarineichkurve	Seite	25
I.	Seite	25
II. 1, 2, 3,	Seite	27
IV.	Seite	28
Tabellen	Seite	31
Glucuronsäureeichkurve	Seite	31
Alizarineichkurve	Seite	31
I.	Seite	31
II. 1,	Seite	33
III.	Seite	34
IV.	Seite	37
Literatur	Seite	38

EINLEITUNG

Alizarin und Ruberythrinsäure sind Oxyanthrachinone. Alizarin ist das 1,2 Dihydroxyanthrachinon. Abb. 1 . Ruberythrinsäure ist das Glykosid zwischen dem Alizarin als Aglukon und der Primverose - 6-d-Xylosido-d-Glukose- als Zuckeranteil. Abb.2.

Alizarin und Ruberythrinsäure sind neben anderen substituierten Anthrachinonen aus der Krappwurzel, einem Laabkrautgewächs, darstellbar.

Beide Oxyanthrachinone vermindern in einem Bereich oberhalb pH 6,8 die Kristallisation von Calciumoxalat und Calciumphosphat. DULCE .

Der Krappwurzelextrakt, auch Färberröte oder Rubia tinctorum genannt, vermindert nach oraler Gabe die Bildung von calciumhaltigen Harnsteinen. MADAUS , KOCH ,KELLER, GÖRLICH.

Unklarheit herrschte bisher über die Ausscheidungsprodukte der beiden Oxyanthrachinone. Alizarin, so glaubte man, würde als Glucuronid eliminiert, wie dies bei Phenolen häufig der Fall ist. Für die Ruberythrinsäure nahm man an, daß sie unverändert ausgeschieden wird und dadurch eine Säuerung des Harnes hervorruft. BAUER .

Angeregt durch die Beobachtungen von MADAUS, KELLER, und DULCE wollen wir in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen klären :

- 1) In welcher Form wird Alizarin beziehungsweise Ruberythrinsäure nach oraler Zufuhr ausgeschieden ?
- 2) Welche Menge Oxyanthrachinonfarbstoff läßt sich nach einmaliger oraler Gabe innerhalb von 24 Stunden im Harn wiederfinden ?
- 3) Zeigen die Ausscheidungsprodukte der beiden Oxyanthrachinone noch Einfluß auf die Kristallisation von Calciumoxalat ?

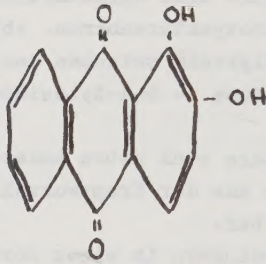


Abb. 1 : ALIZARIN

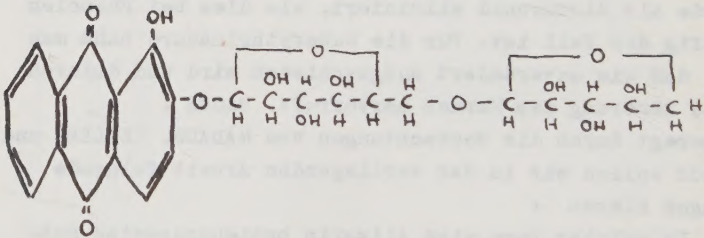


Abb. 2 : RUBERYTHRINSÄURE

VERSUCHSANORDNUNG

I. Isolierung der im Harn ausgeschiedenen Oxvanthrachinonfarbstoffe .

Der Harn von mit Alizarin bzw. Ruberythrinsäure gefütterten Ratten wurde stündlich gesammelt. Nach Aufarbeiten und Einstellen des Harnes auf pH 4 wurden die Oxvanthrachinone chromatographisch abgetrennt. Die dabei auftretende gelb-rote Bande wurde eluiert. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer eingengt, getrocknet und anschließend mit absolutem Alkohol behandelt. Die in Alkohol unlösliche Fraktion wurde abzentrifugiert, in Aqua dest. gelöst und nochmals im Rotationsverdampfer eingengt. Hierrauf folgte wieder ein Ausschütteln mit absolutem Alkohol. Der jetzt abzentrifugierte Teil bildete die Fraktion I, der beim Zentrifugieren anfallende Überstand wurde mit Aktivkohle mehrfach gereinigt und anschließend im Rotationsverdampfer eingengt; der Trockenrückstand bildete die Fraktion II.

Fraktion Ia und Fraktion II gewonnen nach Alizarinverfütterung sowie Fraktion Ib gewonnen nach Ruberythrinsäureverfütterung wurden auf ihren Gehalt an Glucuronsäure und Alizarin untersucht.

II. IDENTITÄTSNACHWEISE

1) Spaltung der Fraktion I mit β -Glucuronidase

Die nach Alizarin -wie auch nach Ruberythrinsäuregabe gewonnene Fraktion I wurde in Puffer pH 5 gelöst. Anschließend incubierten wir mit β -Glucuronidase. Das dabei freiwerdende Alizarin wurde jede Minute zehn Minuten lang im Photometer bei 578 m μ gemessen. Als Kontrolle diente

die Incubation reiner Ruberythrinsäure mit β -Glucuronidase.

2) Absorptionsspektren der Oxyanthrachinone und ihrer Ausscheidungsprodukte .

Von folgenden Substanzen wurden in Sörensen Puffer von pH 11 gelöst die Absorptionsspektren mit Hilfe eines automatisch-registrierenden Spektralphotometers aufgezeichnet :

- a) Alizarin
- b) Ruberythrinsäure vor und nach Incubation mit β -Glucuronidase.
- c) Fraktion I, gewonnen nach Alizarin- und Ruberythrinsäureverfütterung , vor und nach Incubation mit β -Glucuronidase.

3) Chromatogramme

Die Oxyanthrachinone und deren Ausscheidungsprodukte wurden vor und nach Incubation mit β -Glucuronidase mit einer Laufzeit von 10 Stunden chromatographiert. Wir bestimmten die ~~KK~~ Rf-Werte.

III. AUSSCHIEDUNGSVERSUCH

Drei Gruppen von je zwölf männlichen Ratten, von denen immer zwei in einem Stoffwechselkäfig saßen, erhielten 6 ml Humanamilch (Nährstufe II) pro Ratte mit der Schlundsonde. Der Harn wurde über zwei Stunden gruppenweise gesammelt und gemessen. Dann erhielten die Ratten der drei Gruppen folgende Substanzen mittels Schlundsonde :

Gruppe A : Kontrollgruppe, 6 ml Humanamilch/ Tier

Gruppe B : 9,6 mg Alizarin in 6 ml Humanamilch gelöst/ Tier
12 Tiere = 115,2 mg Alizarin

Gruppe C : 21,3 mg Ruberythrinsäure in 6 ml Humanamilch gelöst pro Tier. 12 Tiere = 256 mg Ruberythrinsäure.

In zweistündlichen Abständen wurde anschließend zwölf Stunden lang der Harn gesammelt und gruppenweise vereinigt. Eine letzte Harnportion wurde 24 Stunden nach Gabe der Oxyanthrachinonfarbstoffe gesammelt. Vier und nochmals acht Stunden nach der Oxyanthrachinongabe erhielt jedes Tier 6 ml reine Humanamilch.

In den einzelnen Harnportionen der drei verschiedenen Gruppen wurden Glucuronsäure -und nach Incubation mit β -Glucuronidase auch Alizarinbestimmungen durchgeführt.

IV. EINFLUSS DER ISOLIERTEN AUSSCHIEDUNGSPRODUKTE DER OXYANTHRACHINONFARBSTOFFE AUF DIE KRISTAL- LISATION VON CALCIUMOXALAT.

Einer Mischung von CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl-Lösung und Barbituratpuffer pH 6,9 wurden hinzugefügt :

- a) die Fraktion Ia
- b) die Fraktion II
- c) Aqua tridest. Kontrolle.

Dann versetzten wir mit Kaliumoxalatlösung und incubierten den Kristallisationsansatz bei 37°C . Alle Stunde wurde 6 Stunden lang je ein Ansatz der drei Versuchsreihen zentrifugiert und im Niederschlag chelatometrisch der Ca-Gehalt bestimmt.

ERGEBNISSE

I. ANALYSE DER IM HARN AUSGESCHIEDENEN OXYANTHRACHINONE.

1) nach Verfütterung von Alizarin

a) Fraktion Ia

Bei der Fraktion Ia handelt es sich um ein ziegelrotes amorphes Pulver, das im sauren Bereich mit gelber Farbe gut, im neutralen mit gelbroter Farbe schlechter, und im basischen Bereich mit roter Farbe wieder gut löslich ist. Die Fraktion Ia besteht zu 40,2% aus Glucuronsäure und zu 49,2 % aus Alizarin. Die restlichen 10,6 % der Trockensubstanz sind noch Verunreinigungen. Die Substanz ist hygroskopisch.

Eine nur einmal mit Alkohol gereinigte Fraktion Ia enthielt 24,5 % Glucuronsäure und 29,2 % Alizarin.

b) Fraktion IIa

Es handelt sich um eine stark hygroskopische Substanz von schwach gelblicher Farbe. Der Glucuronsäureanteil betrug 0,55 %, der Alizarinanteil 0,4 %. Ungefähr 99 % sind frei von Oxyanthrachinonderivaten.

2) nach Verfütterung von Ruberythrinsäure

a) Fraktion Ib

Hier handelt es sich ebenfalls um ein ziegelrotes amorphes Pulver, das die gleichen Löslichkeitsverhältnisse zeigt wie die nach Alizarinverfütterung gewonnene Fraktion Ia.

In der nach Ruberythrinsäuregabe gewonnenen Fraktion Ib wurde nach einmaliger Alkoholbehandlung der Glucuronsäureanteil zu 22,2 % und der Alizarinanteil zu 24,6 % bestimmt.

II.

IDENTITÄTSNACHWEISE

1) Spaltung mit β -Glucuronidase

Aus den Fraktionen Ia und Ib, die nach Alizarin -beziehungsweise Ruberythrinsäureverfütterung gewonnen waren, wird innerhalb von 7 Minuten das gesamte Alizarin freigesetzt, wenn mit β -Glucuronidase incubiert wird. Nach incubation von reiner Ruberythrinsäure mit β -Glucuronidase wird kein Alizarin freigesetzt, das im Gegensatz zu Ruberythrinsäure und den Fraktionen Ia und Ib bei 578 m μ ein typisches Absorptionsmaximum hat.

2) Absorptionsspektren der Oxyanthrachinone

Ruberythrinsäure und die nach Alizarin -wie auch nach Ruberythrinsäureverfütterung gewonnenen Fraktionen Ia und Ib zeigen identische Absorptionsspektren mit einem Maximum bei 490 m μ . Abb. 3 .

Alizarin zeigt eine typische Kurve mit einem steilen Maximum bei 578 m μ . Abb. 4 .

Spaltet man die nach Alizarinverfütterung gewonnene Fraktion Ia mit β -Glucuronidase, so erhält man wieder die typische Alizarinkurve mit ihrem Maximum bei 578 m μ . Abb. 5 .

Spaltet man die Fraktion Ib, isoliert nach Ruberythrinsäureverfütterung, mit β -Glucuronidase, so erhält man wiederum das Absorptionsspektrum des Alizarins. Abb. 6 . Incubiert man reine Ruberythrinsäure mit dem Enzym so ändert sich das Spektrum in der Incubationszeit von 10 Minuten nicht. Abb 7 .

3) Chromatogramme

Die nach Alizarin -und auch Ruberythrinsäuregabe isolierten Fraktionen Ia und Ib haben identische Rf-Werte. Ruberythrinsäure besitzt einen Rf-Wert von 0,830. Reines

Alizarin wandert in der Lösungsmittelfront.

Inkubiert man die Harnfraktionen Ia und Ib und Ruberythrinsäure zehn minutenlang mit β -Glucuronidase, so wird aus den beiden Fraktionen I Alizarin freigesetzt, das bei dem verwandten Fließmittel mit der Front läuft. Bei gleicher Inkubationsdauer ändert Ruberythrinsäure ihren Rf-Wert nicht. Siehe Tabelle :

Rf- erte der Oxyantarachinone im Lösungsmittel

n-Propanol (4 Volumenteile), Äthylacetat (3 Volumenteile) und H_2O (3 Volumenteile).

Alizarin 1,0

Ruberythrinsäure 0,83

Harnfraktion Ia, isoliert nach Alisaringabe 0,644

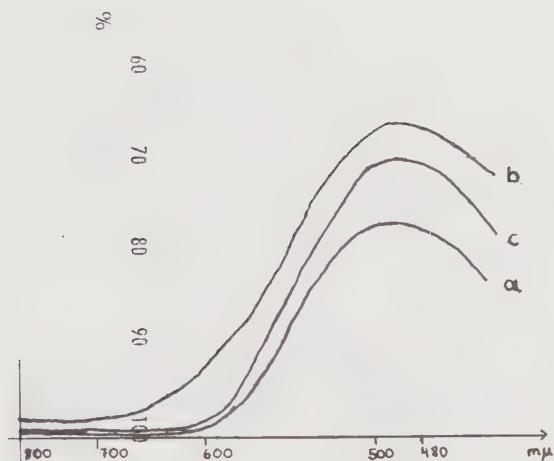
Harnfraktion Ib, isoliert nach Ruberythrinsäuregabe 0,644

Harnfraktion Ia nach Incubation mit β -Glucuronidase 1,0

Harnfraktion Ib nach Incubation mit β -Glucuronidase 1,0

Ruberythrinsäure nach Incubation mit β -Glucuronidase 0,83

Abb. 3 : ABSORPTIONSSPEKTREN DER HARNFRAKTIONEN Ia UND Ib, ISOLIERT NACH ALIZARIN - UND AUCH RUBERYTHRINSÄUREGABE, UND DER RUBERYTHRIN'-SÄURE.



a) Harnfraktion Ia, isoliert nach Alizaringabe.

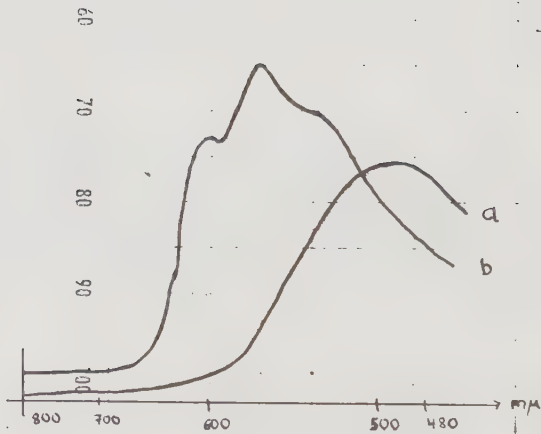
3 /ml Meßansatz

b) Harnfraktion Ib, isoliert nach Ruberythrin-

säuregabe. 4 /ml Meßansatz

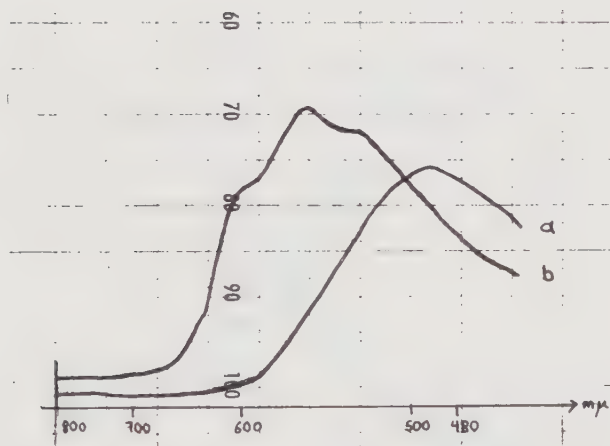
c) Ruberythrinsäure, 1,7 / ml Meßansatz

Abb. 4: ABSORPTIONSSPEKTREN VON HARNFRAKTION Ia
UND ALIZARIN



- a) Harnfraktion Ia, isoliert nach Alizaringabe
3 /ml Meßansatz
- b) Alizarin, 1,2/ ml Meßansatz.

Abb. 5 : ABSORPTIONSSPEKTREN VON HARNFRAKTION Ia,
 VOR UND NACH INCUBATION MIT β -GLUCURONI-
 DASE.



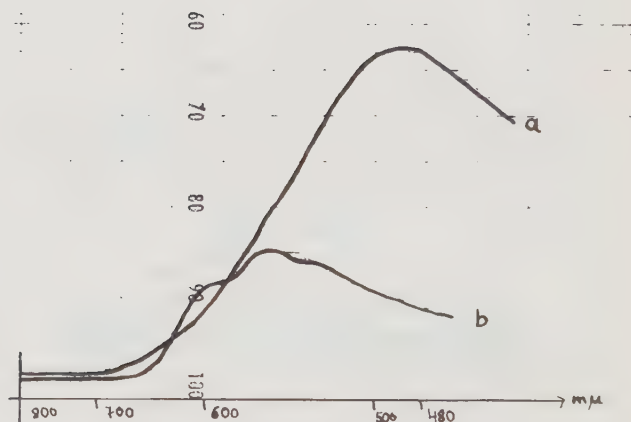
a) Harnfraktion Ia, isoliert nach Alizaringabe

3/ml Meßansatz

b) Harnfraktion Ia nach Incubation mit

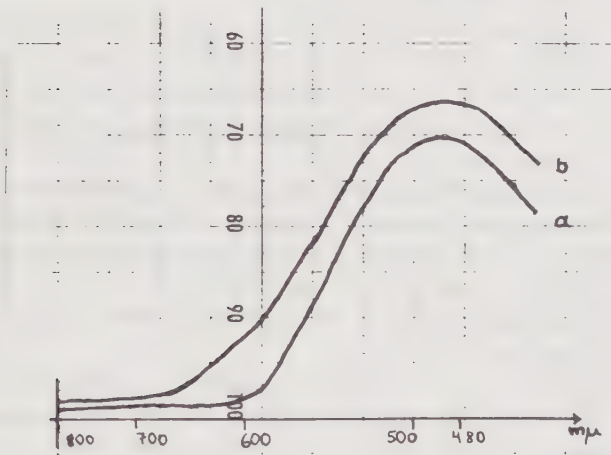
β -Glucuronidase.

Abb. 6 : ABSORPTIONSSPEKTREN VON HARNFRAKTION Ib,
VOR UND NACH INCUBATION MIT β -GLUCURO-
NIDASE.



- a) Harnfraktion Ib, isoliert nach Ruberythrin-
säuregabe, 4/ml Meßansatz
- b) Harnfraktion Ib nach Incubation mit
 β -Glucuronidase

Abb. 7 : ABSORPTIONSSPEKTREN VON RUBERY-
 THRINSÄURE VOR UND NACH INCUBATION
 MIT β -GLUCURONIDASE.



- a) Ruberythrinsäure 1,1/ml Meßansatz
- b) Ruberythrinsäure nach Incubation mit
 β -Glucuronidase

III.

AUSSCHIEDUNGSVERSUCH

Nach einer Verfütterung von insgesamt 115,2 mg Alizarin an zwölf Ratten wurden im Sammelharn innerhalb von zwölf Stunden 9,49 mg Alizarin wiedergefunden. Das sind 8,2 % der verabfolgten Menge. Nach 24 Stunden waren 11,93 mg gleich 10,4 % der oral zugeführten Alizarinmenge im Harn ausgeschieden. Abb. 8 .

Nach Gabe von Ruberythrinsäure in einer dem Alizarin äquivalenten Menge wurden im Sammelharn innerhalb von zwölf Stunden 7,15 mg Alizarin gefunden. Das entspricht 6,2 % der oral mit der Ruberythrinsäure zugeführten Alizarinmenge. Nach 24 Stunden waren 9,02 mg Alizarin gleich 7,8 % der zugeführten Alizarinmenge ausgeschieden. Abb. 8. Die Glucuronsäureausscheidung wurde durch Alizaringabe innerhalb der ersten zwölf Stunden gegenüber dem Leerwert von 28,42 mg um 10,9 mg erhöht. Abb. 9 .

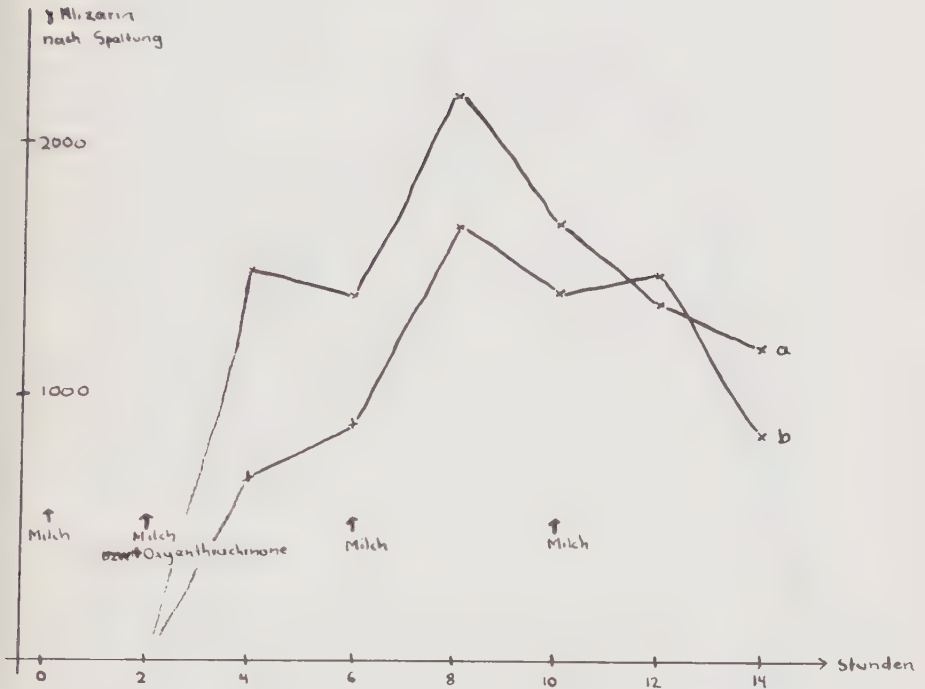
Die Mehrausscheidung an Glucuronsäure nach Ruberythrinsäuregabe betrug 7,51 mg.

Das Maximum der Alizarinausscheidung ist nach sechs Stunden erreicht, einer Zeit, zu der die Glucuronsäureausscheidung auch im Kontrollversuch ihr Maximum überschreitet. Abb. 9 .

IV. EINFLUSS DER HARNFRAKTION I UND II AUF DIE KRISTALLISATION VON CALCIUMOXALAT IN VITRO.

Fraktion I hemmt die Kristallisation von Calciumoxalat. Der Effekt ist in der ersten Stunde am stärksten. 718 , Harnfraktion I hindern innerhalb von 3 Stunden ca. 40 % Calcium als Calciumoxalat auszufallen. Abb. 10.

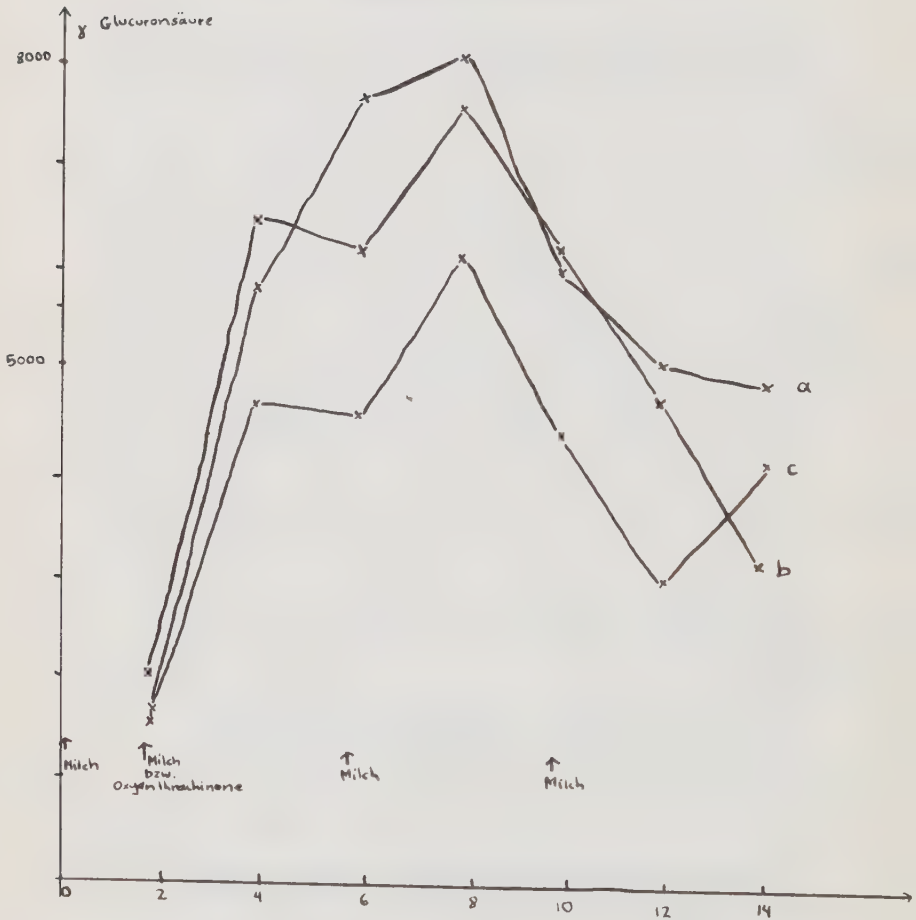
Abb. 8 : OXYANTHRACHINONAUSSCHEIDUNG IM HARN NACH
OXYANTHRACHINONGABE BEI RATTEN.



Messung im Sammelharn von je 12 Ratten. Einzelne
Milchgabe 6 ml pro Ratte.

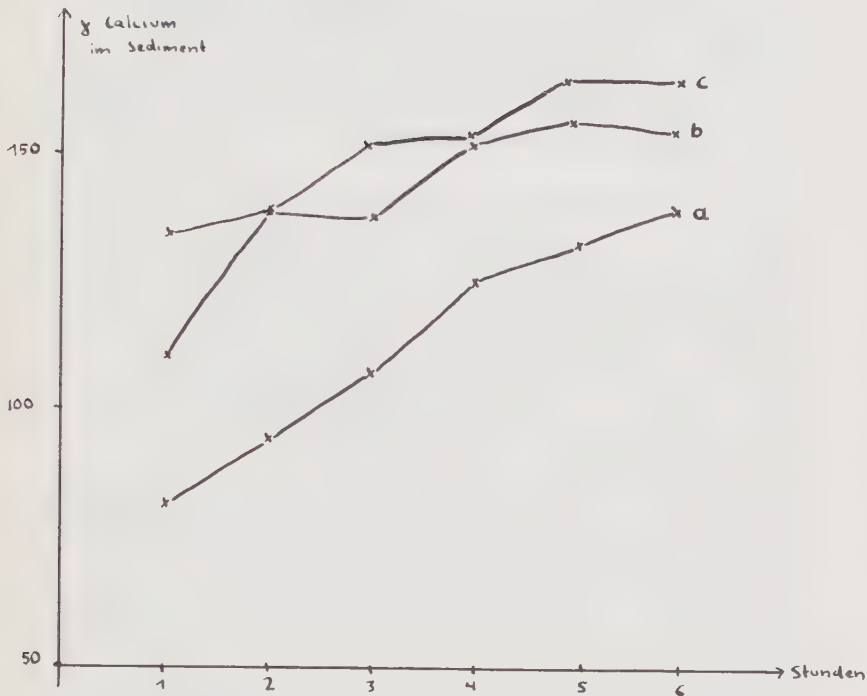
- a) Alizarin = 115,2 mg pro 12 Ratten in 72 ml Milch
gelöst. Verabreicht 2 Stunden nach
Versuchsbeginn.
- b) Ruberythrinsäure = 256 mg/zwölf Ratten in 72 ml Milch
gelöst. Verabreicht wie oben.

Abb. 9 : GLUCURONSÄUREAUSSCHIEDUNG IM HARN BEI
RATTEN NACH OXYANTHRACHINONGABE



- a) Alizarin 115,2 mg Alizarin/ 12 Ratten in 72 ml Milch
gelöst. Gegeben 2 Stunden nach Versuchsbeginn
- b) Ruberythrinsäure 256 mg/ 12 Ratten in 72 ml Milch
gegeben zwei Stunden nach Versuchsbeginn
- c) Kontrollgruppe erhielt nur Milch, keine Oxyanthra-
chinongabe.

Abb. 10 : EINFLUSS VON HARNFRAKTION I UND HARNFRAKTION II AUF DIE KRISTALLISATION VON CALCIUMOXALAT IN VITRO.



Kristallisationsansatz : 1 ml 0,94 m NaCl, 1 ml 0,0299 m $MgCl_2$, 1,5 ml Veronalpuffer pH 6,9, 1 ml 0,005 m Kaliumoxalat, 0,5 ml 0,06 m $CaCl_2$, Incubiert bei 37 C. weitere Zugabe von :

- a) Harnfraktion I (Alizaringlucuronid) 718 /ml Aqua tr.
- b) Harnfraktion II 1625 /ml Aqua tridest
- c) Kontrolle 1 ml Aqua tridest

DISKUSSION

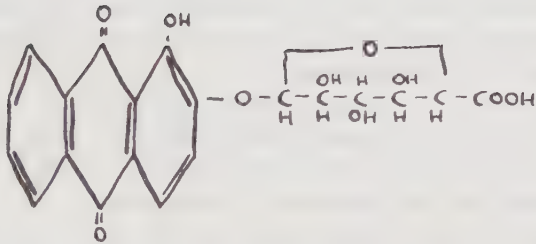
Glucuronsäure spielt bei der Elimination von körpereigenen wie auch körperfremden Substanzen eine wichtige Rolle. Diese Tatsache ist seit der Arbeit von SCHMIEDEBERG bekannt und immer wieder bestätigt worden. Man weiß, daß Alkohole und Phenole als Ätherglucuronide und organische Säuren als Esterglucuronide ausgeschieden werden.

Alizarin, als körperfremde Substanz, wird, wie die vorgelegten Untersuchungen an Ratten zeigen, als Glucuronid im Harn ausgeschieden: Die isolierte Substanz besteht aus äquivalenten Mengen Glucuronsäure und Alizarin (Harnfraktion Ia), sowie einer geringen Verunreinigung (Harnfraktion II). Das Molegewichtsverhältnis beträgt Alizarin : Glucuronsäure gleich 240 : 194. Man kann daraus schließen, daß es sich um ein Alizarinmonoglucuronid handelt. Abb. 11.

Weitere Beweise dafür, daß es sich bei der nach Alizarinverfütterung gewonnenen Fraktion Ia um Alizarin-glucuronid handelt, liefert ihre Spaltung mit β -Glucuronidase, wobei Alizarin freigesetzt werden kann, das papierchromatographisch und durch Absorptionsspektren identifiziert wurde.

Da Alizarin-glucuronid das gleiche Absorptionsspektrum wie Ruberythrinsäure aufweist, deren Zuckeranteil an die OH-Gruppe in 2 Stellung gebunden ist, darf man annehmen, daß auch die Glucuronsäure über die OH-Gruppe in Stellung 2 verästert ist. Dies steht im Einklang damit, daß die OH-Gruppe in Stellung 1 eine starke Nebenvalenzbindung zu der benachbarten Oxogruppe besitzt. HALL. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es sicher, daß oral verabfolgte Ruberythrinsäure im Harn auch als Alizarinmonoglucuronid ausgeschieden wird. Ruberythrinsäure

Abb. 11 : WAHRSCHEINLICHE STRUKTUR DES
ALIZARINMONOGLUCURONIDS



und ihr Ausscheidungsprodukt unterscheiden sich durch ihre Rf-Werte und ihre Absorptionsspektren.

Da bei der Isolierung der Fraktion Ib nur einmal mit Alkohol ausgeschüttelt wurde, war die Substanz nur zu etwa 47 % gereinigt. Einen ähnlichen Reinheitsgrad erreichten wir durch einmalige Alkoholanwendung bei der Isolierung der Fraktion Ia nach Alizaringabe.

Die oral zugeführten Oxyanthrachinonfarbstoffe werden im Harn innerhalb von 24 Stunden zu ca. 10 % (nach Alizaringabe) und ca. 8 % (nach Ruberythrinsäureverfütterung) wahrscheinlich überwiegend als Glucuronid wiedergefunden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden von BODE, die nach Applikation von Oxybenzoesäuren eine Erhöhung der Glucuronsäureausscheidung um 10 bis 15 % gegenüber dem Leerwert beobachtete.

Bei den Ausscheidungsversuchen wurde eine um ca. 50 % höhere Glucuronsäuremehrausscheidung (= 10,9 mg) gemessen als unter Zugrundelegen eines Alizaringlucuronids auf Grund der eliminierten Alizarinmenge (= 9,5 mg) zu erwarten war. Anscheinend kommt es nach Oxyanthrachinongabe zu einer überschießenden Bildung von Glucuronsäure, die dann als freie Glucuronsäure ausgeschieden wird, wie FURNS es nach Veronalapplikation sah.

Das Maximum der Ausscheidung der Oxyanthrachinone fällt zusammen mit dem Maximum der Ausscheidung von Glucuronsäure nach Milchapplikation. Es ist deshalb anzunehmen, daß für die renale Oxyanthrachinonausscheidung nicht nur die Glucuronidierung sondern auch die Resorption der Farbstoffe bestimmend ist.

Da nur 10 % des zugeführten Farbstoffes innerhalb von 24 Stunden im Harn erscheinen, müssen die restlichen 90 % entweder nicht resorbiert, retiniert oder anderweitig eliminiert sein. Ein Teil der resorbierten Menge kann am Knochen fixiert werden. RICHTER beschrieb eine kräftige Rotfärbung der Knochen und hier besonders der

Wachstumszonen nach Gabe von Alizarin. Über die Galle könnte eine extrarenale Elimination stattfinden.

Da KELLER und GÖRLICH durch Gabe von Rubiaextrakten die experimentelle Harnsteinbildung bei Ratten einschränken konnten, mußte man annehmen, daß die Ausscheidungsprodukte der Ox,anthrachinone die Kristallisation von Calciumsalzen hemmen. Diese Vermutung kann jetzt bestätigt werden. Das aus dem Harn isolierte Ausscheidungsprodukt, Alizarinmonoglucuronid, hemmt die Kristallisation von Calciumoxalat. Durch 718, Alizarin glucuronid werden ca 40% Calcium innerhalb von 5 Stunden am Kristallisieren als Calciumoxalat verhindert.

Als Ursache dieser Kristallisationshemmung kann man ein Ca-Chelat annehmen. Die Einlagerung des Calcium könnte zwischen der phenolischen OH-Gruppe und dem benachbarten Nitro-Sauerstoff erfolgen.

ZUSAMMENFASSUNG

- I. 1) Bei Ratten läßt sich nach Alizarinverfütterung aus dem Harn eine Fraktion isolieren, die zu etwa 89 % gereinigtes Alizarinmonoglucuronid darstellt. Das Alizarinmonoglucuronid wurde durch quantitativen Nachweis der Oxyanthrachinon -und der Glucuronsäurekomponente, durch enzymatische Spaltung und durch vergleichende Absorptionsspektren und Chromatogramme identifiziert.
- 2) Ruberythrinsäure wird bei Ratten nach oraler Gabe ebenso wie Alizarin als Alizarinmonoglucuronid im Harn ausgeschieden. Dies konnte bewiesen werden durch den Nachweis der Identität der beiden nach Alizarin -und nach Ruberythrinsäureverfütterung aus dem Harn isolierten Oxyanthrachinonderivate.
- II. Innerhalb von 24 Stunden findet man bei Ratten etwa 10 % der zugeführten Alizarinmenge wahrscheinlich als Glucuronid im Harn wieder. Bei der Ruberythrinsäure beträgt der Wert ungefähr 8 %. Das Maximum der Ausscheidung beider Substanzen liegt sechs Stunden nach einmaliger oraler Zufuhr.
- III. Alizarinmonoglucuronid hemmt in vitro die Kristallisation von Calciumoxalat, ist also wahrscheinlich in der Lage, Calcium chelatartig zu binden.

METHODIK

1) Glucuronsäureeichkurve nach DISCHE

Reagenzien : Glucuronsäurelacton

96% H₂SO₄

Carbazol

unvergällter absoluter Alkohol

Es wurden eine 0,1% Glucuronsäurestammlösung und daraus eine Verdünnungsreihe von 10₃-100 γ hergestellt. 1 ml dieser Eichwerte wurden mit 6 ml 96% H₂SO₄ unter Kühlung versetzt und anschließend im kochenden Wasserbad 20 min erhitzt. Nach Abkühlung wurden 0,2 ml einer jeweils frisch zubereiteten 0,1% alkoholischen Carbazollösung hinzugefügt. Nach 2 Stunden wurde der Ansatz in einer 1 cm Küvette bei der Wellenlänge von 546 m μ gemessen. Als Leerwert diente der gleiche Ansatz dem an Stelle der alkoholischen Carbazollösung 0,2 ml reiner unvergällter absoluter Alkohol hinzugefügt wurde. Die Ablesung der unbekannten Meßwerte erfolgte aus dieser Eichkurve.

2) Alizarineichkurve :

Reagenzien : 0,1 m NaOH

0,1 m NaCl

0,1 m Glycin

Alizarin

Es wurden aus Sörensen Puffer pH 11 und aus einer Alizarinstammlösung von 5 mg% durch Lösen im Puffer Eichwerte zwischen 1 γ und 10 γ hergestellt. Die Messung erfolgte in einer 1 cm Küvette im Photometer Eppendorf bei der Wellenlänge von 578 m μ . Als Leerwert diente der Puffer. Die Ablesung der unbekannten Meßwerte erfolgte aus dieser Eichkurve.

I. ISOLIERUNG DER SUBSTANZEN AUS DEM HARN

Reagenzien : Ruberythrinsäure

Alizarin

n/10 HCl

n-Propanol

Äthylacetat

abs. unvergällter Alkohol

Papier Schleicher-Schüll 2043 b

An männliche Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 263 g wurde Alizarin (ca. 0,5g/Tier) beziehungsweise Ruberythrinsäure (ca. 1 g/ Tier) mit einer Schlundsonde verfüttert. Jeweils 10 Ratten setzten wir in große Kaninchenstoffwechselkäfige, die ein Auffangen des Harnes ermöglichten. Der Harn wurde alle Stunde sechs Stunden lang gesammelt und bei -18°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt. Nach Filtern wurde der Harn durch Zugabe von n/10 HCl unter pH-Kontrolle auf pH 4 angesäuert. Anschließend zentrifugierten wir und trugen den Überstand mit einer 0,2 ml Pipette auf Chromatogrammpapier Schleicher-Schüll 2043b möglichst reichlich auf. Die Chromatogramme wurden dann in dem Fließmittel n-Propanol (4 Volumenteile), Äthylacetat (3 Volumenteile) und H_2O (3 Volumenteile), HAIS, mit einer Laufzeit von 10 Stunden entwickelt. Die in dieser Zeit sich deutlich abgrenzende gelb-rote Bande wurde ausgeschnitten und in Aqua bidest. eluiert, das Eluat im Rotationsverdampfer eingedampft und anschließend mit Alkohol extrahiert. Es ergaben sich zwei Fraktionen, eine in Alkohol unlösliche, rot gefärbte Substanz, und eine in Alkohol lösliche, gelb gefärbte Substanz. Die in Alkohol unlösliche Substanz wurde abzentrifugiert, in Aqua bidest erneut gelöst und nochmals im Rotationsverdampfer getrocknet. Nach mehrmaligen Ausschütteln mit Alkohol ergab der in Alkohol unlösliche, abzentrifugierte und getrocknete Teil die Fraktion I. Die in Alkohol lösliche Substanz wurde mit Aktivkohle mehrmals gereinigt und danach ebenfalls im Rotationsverdampfer eingengt und getrocknet. Wir erhielten die Fraktion II.

II.

IDENTITÄTSNACHWEISE

1)

Spaltung mit β -Glucuronidase

Reagenzien : 0,2 m Essigsäure
0,2 m Natriumacetat
-Glucuronidase (Ketolase
= 5000 Fishmann-Einheiten/ ml)
2 n NaOH
0,1 m Sörensen Puffer pH 11

Die Harnfraktion Ia und Ib wurden in 10 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5 gelöst. Hiervon wurden jeweils 1 ml mit weiteren 2 ml Puffer pH 5 versetzt und mit 0,2 ml Ketolase (= 1000 Fishmann-Einheiten) bei 37°C im Wasserbad incubiert. Bei den zehn Ansätzen wurde die Reaktion nach 1 min bis 10 min durch Zugabe von 0,3 ml 2 n NaOH unterbrochen und nach Gabe von 3 ml 0,1 m Sörensen Puffer pH 11 das freigewordene Alizarin wie oben angegeben bestimmt.

2)

Absorptionsspektren

Die Oxyanthrachinone und deren Ausscheidungsprodukte vor und nach Incubation mit β -Glucuronidase wurden in 0,1 m Sörensen-Glycin-Puffer von pH 11 gelöst. Die Absorptionsspektren zeichneten wir mit dem automatischregistrierenden Spektralphotometer Zeiss im Bereich zwischen 800 m μ bis 450 m μ auf.

3)

Chromatogramme

Reagenzien : 0,1 m Sörensen-Glycin-Puffer pH 11
n-Propanol
Äthylacetat

Die Oxyanthrachinone und die Harnfraktionen Ia und Ib vor und nach Incubation mit β -Glucuronidase wurden in Sörensen-Puffer pH 11 gelöst, auf Papier Schleicher-Schüll 2043 b aufgetragen und in dem schon unter II beschriebenen Fließmittel entwickelt. Die Laufzeit betrug 10 Stunden.

IV.

CALCIUMOXALATKRISTALLISATIONSVERSUCH

Reagenzien : NaCl

MgCl₂

0,1 m Barbital-Natriumpuffer pH 6,9

Kaliumoxalat

CaCl₂

Ammoniakwasser

2n H₂SO₄

2n NaOH

m/400 Titriplexlösung

Murexidlösung = 7,5 mg Murexid in

25 ml eines 1:1 Volumengemisches von

Aqua tridest und Propylenglykol gelöst.

Es wurden in Zentrifugenröhrchen jeweils sechs Doppelansätze bestehend aus 1 ml 0,94 m NaCl-Lösung, 1 ml 0,0299 m MgCl₂-Lösung, 1,5 ml 0,1 m Barbitalpuffer pH 6,9 und 1 ml 0,005 m Kaliumoxalatlösung hergestellt. Dazu pipettierten wir bei einer Serie jeweils 0,25 ml einer 0,3%igen Alizarinringlucaronidlösung, bei einer zweiten Serie jeweils 0,25 ml einer 0,65%igen Lösung von Fraktion II und bei den Leerversuchen 0,25 ml Aqua tridest. Schließlich starteten wir die Kristallisation durch Hinzufügen von jeweils 0,75 ml Aqua tridest und 0,5 ml einer 0,06 m CaCl₂-Lösung. Die Incubation der Ansätze erfolgte bei 37°C.

Alle Stunde wurde ein Doppelansatz bei 3000 U/min 30 minutemlang zentrifugiert, der Überstand dekantiert, der Rückstand mit Ammoniakwasser gewaschen, nochmals 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der erhaltene kristalline Rückstand wurde in 2 ml einer 2n H₂SO₄ gelöst und auf 10 ml Aqua tridest aufgefüllt. In diesem Volumen bestimmten wir den Calciumgehalt chelatometrisch nach SIEGMUND und DULCE : 9 ml Aqua tridest, 2 ml 2n NaOH und 0,5 ml des auf 10 ml gelösten Sedimentes wurden in eine

4 cm Küvette pipettiert. Dann fügten wir während die Küvette im Photometer Eppendorf stand, 0,3 ml der Murexidlösung als Indikator unter Rühren hinzu. Für die Nullpunkteinstellung diente ein Standardfilter. Sofort nach der Murexidsugabe und nach Titrieren in Schritten x von ca. 20 μ l mit $m/400$ Titriplexlösung wurde die Extinktion bei 480 m μ gemessen. Die Titration erfolgte mit einem Mikrodosimeter Ingold. Die Meßwerte werden in ein Koordinatensystem eingetragen, auf dessen Ordinate die Extinktionswerte und Abszisse die verbrauchten μ l Titriplex eingetragen sind. Man erhält auf diese Weise zwei sich in einem stumpfen Winkel ~~stark~~ treffende Gerade. Der Schnittpunkt der beiden Geraden gibt die der vorgelegten Calciummenge Äquivalenten μ l Titriplex an. Von diesem Wert muß noch der Leerwert des Ansatzes abgezogen werden.

Durch Multiplizieren der Differenz μ l Titriplex mit dem Faktor 2 errechneten wir die γ Calcium im Sediment der Ansätze.

Bei der Leerwertsbestimmung gingen wir folgendermaßen vor : In eine 4 cm Küvette wurden 9,8 bzw. 9,9 ml Aqua tridest und 2 ml einer 2n NaOH pipettiert. Hinzugefügt wurden 0,2 bzw. 0,1 ml einer exakt eingestellten 10mg% CaCl_2 -Lösung. Nach Zugabe von 0,3 ml Murexidlösung und Umrühren wurde während der Titration mit Titriplexlösung in ca. 20 μ l Schritten die Extinktion gemessen. Der Schnittpunkt der beiden Geraden stellt den Äquivalenzpunkt dar. Dann wurden die verbrauchten μ l nach Eingabe von 0,1 ml CaCl_2 -Lösung von den verbrauchten μ l nach Eingabe von 0,2 ml CaCl_2 -Lösung subtrahiert. Die so erhaltenen μ l $m/400$ Titriplexlösung wurden von den verbrauchten μ l nach Eingabe von 0,1 ml CaCl_2 -Lösung abgezogen. Es resultiert der Leerwert der Methode. Bei den Ansätzen, zu denen Alizarin-lucuronid hinzugefügt wurden, war etwas Oxyanthrachinon mit dem Ca-Oxalat-Niederschlag koprezipitiert.

Alizarin glucuronid störte mit seinem Eigenfarbton, Absorptionsmaximum bei 490 m μ ; die Calciumtitration bei der Wellenlänge von 480 m μ . Es wurden deshalb die Ansätze mit Alizarin glucuronid erst gegen das Standardfilter und dann auf Null gestellt.

TABELLEN UND RECHNUNGEN

1) Glucuronsäureeichkurve

	Extinktionswert (Mittelwert von sechs Messungen)
10 %	0,066
20 %	0,134
40 %	0,265
50 %	0,332
100 %	0,659

2) Alizarineichkurve

	Extinktionswert (Mittelwert von sechs Messungen)
1 %	0,035
2 %	0,070
2,5 %	0,089
4 %	0,138
5 %	0,175
10 %	0,347

I. ANALYSE DER AUSGESCHIEDENEN OXYANTHRACHINONDERIVATE

1) Fraktion Ia nach Alizarinverfütterung

a) Glucuronsäuregehalt :

402 : Fraktion Ia aufgelöst in 4 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5, davon Doppelbestimmung in je 1 ml. Extinktionen : 0,258 und 0,255. Dies entspricht 39,1 Glucuronsäure / ml. Dies ist 156,4 in 402, Fraktion Ia.

454 : Fraktion Ia aufgelöst in 4 ml Acetatpuffer pH 5, davon Doppelbestimmung in je 1 ml. Extinktion : 0,310 und 0,314. Dies entspricht 47,3 Glucuronsäure / ml = 189,2 in 454, Fraktion Ia.

b) Alizaringehalt :

512 : Fraktion Ia gelöst in 4 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5, davon je 1 ml versetzt mit weiteren 0,5 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5 und 0,5 ml Ketolase. bei 37 °C für 10 min incubiert. Durch Zugabe von 0,1 ml 2n NaOH wurde die Reaktion

unterbrochen. Von dem Gesamtvolumen von 5,1 ml wurde 1 ml mit 4 ml 0,1 m Sörensen Puffer pH 11 versetzt und der Alizaringehalt bestimmt. Insgesamt 4 Ansätze.

Extinktionen : 0,09 0,087 0,088 0,088

Pro Ansatz waren 128 μ Fraktion Ia vorhanden, in denen 63 μ Alizarin nachgewiesen wurden.

2) Fraktion Ia, einmalige Alkoholextraktion.

a) Glucuronsäuregehalt :

3714 μ Fraktion Ia wurden in 10 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5 gelöst, davon je 1 ml zur Glucuronsäurebestimmung.

Extinktionen : 0,598 0,607 0,610. Dies entspricht 91,6 μ Glucuronsäure/ml oder 916 μ in 3714 μ dieser Fraktion Ia

b) Alizaringehalt

1 ml der gleichen Lösung der Fraktion Ia wurde mit 3,5 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5 und 0,5 ml β -etolase versetzt und bei 37°C 10 minutenlang incubiert. Durch Zugabe von 0,2 ml 2n NaOH unterbrochen wir die Hydrolyse, verdünnten jeden Ansatz mit 10 ml 0,1 m Sörensenpuffer XX pH 11 und bestimmten den Alizaringehalt. Extinktionen : 0,254 0,254 0,249. Wir fanden 108,5 μ Alizarin/ml, was 1085 μ Alizarin in 3714 μ dieser Fraktion Ia entspricht.

3) Fraktion Ib nach Ruberythrinsäuregabe.

a) Glucuronsäuregehalt.

1527 μ Fraktion Ib in 10 ml Acetatpuffer pH 5 gelöst, davon drei Bestimmungen in je 1 ml. Extinktionen :

0,218 0,220 0,213. Das entspricht 33,9 μ Glucuronsäure/ml oder 339 μ Glucuronsäure in 1527 μ Fraktion Ib.

b) Alizaringehalt

1 ml der gleichen Lösung der Fraktion Ib wurde mit 3,5 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5 und 0,5 ml β -etolase versetzt und bei 37°C incubiert. Durch Zugabe von 0,2 ml 2n NaOH wurde die Hydrolyse unterbrochen. Nach Zugabe von je 10 ml eines 0,1 m Sörensen Puffers pH 11 bestimmten wir dann

Das Alizarin. Extinktionen : 0,087 0,088 0,083.
Das entspricht 37,6 μ g Alizarin/ml oder 376 μ g Alizarin
in 1527 μ g Fraktion Ib.

4) Fraktion II nach Alizaringabe

a) Glucuronsäuregehalt :

21660 μ g Fraktion II wurden in 10 ml 0,2 m Acetatpuffer
pH 5 gelöst. Davon je 1 ml zur Glucuronsäurebestimmung.
Extinktionen : 0,070 0,083 0,076 . Das entspricht
11,81 μ g Glucuronsäure/ml oder 118,1 μ g in 21660 μ g Fraktion II.

b) Alizaringehalt

1 ml der gleichen Lösung der Fraktion II wurde mit
1,5 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5 und 0,5 ml Ketolase
versetzt und 10 minutenlang bei 37 C incubiert. Die Hydro-
lyse wurde unterbrochen durch Zugabe von 0,1 ml 2n NaOH
und nach weiterer Zugabe von 2ml 0,1 m Sörensen Puffer
pH 11 wurde der Alizaringehalt bestimmt. Extinktionen :
0,287 0,298 0,279 . Dies entspricht 8,54 μ g Alizarin/
ml oder 84,3 μ g Alizarin in 21660 μ g Fraktion II

II.

IDENTITÄTSNACHWEISE

1) Spaltung mit β -Glucuronidase

Hierbei wurden 1583 μ g der Fraktion Ia, 2234 μ g der Fraktion
Ib und 1227 μ g Merythrin-säure jeweils in 10 ml 0,2m Ace-
tatpuffer pH 5 gelöst und in der angegebenen Weise benan-
delt mit β -Glucuronidase. Es ergaben sich folgende Ex-
tinktionswerte bei 578 m μ .

Minuten	Fraktion Ia	Fraktion Ib	Merythrin-säure
1	0,083	0,073	0,069
2	0,151	0,091	0,071
3	0,213	0,142	0,068
4	0,280	0,198	0,070
5	0,315	0,245	0,069
6	0,328	0,278	0,073
7	0,334	0,275	0,072
8	0,328	0,290	0,069
9	0,330	0,291	0,072
10	0,331	0,291	0,072

III.

AUSSCHIEDUNGSVERSUCH

1) Harnvolumina als Gesamtmenge in einer Rattengruppe.

Jede Rattengruppe umfaßt 12 Tiere.

Uhrzeit	Leerversuch	Alizaringabe	Ruberythrinsäuregabe
9 (sondiert)	4 ml	4,5 ml	3,5 ml
11 (sondiert)	18 ml	14,0 ml	19,0 ml
13	18 ml	14,0 ml	19,0 ml
15 (sondiert)	13 ml	15,0 ml	16,0 ml
17	34 ml	32,0 ml	30,0 ml
19 (sondiert)	14 ml	19,0 ml	17,0 ml
21	20 ml	24,0 ml	25,0 ml
23	17 ml	19,0 ml	15,0 ml
11 (24 Stunden ⁴⁵ später)	45 ml	48,0 ml	39,0 ml

2) Alizarinbestimmung im Harn nach Alizaringabe.

1 ml Harn wurde mit 1 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5 und 0,5 ml Ketolase versetzt und die Hydrolyse mit 0,2 ml 2n NaOH unterbrochen. Zugabe von x ml eines 0,1 m SörensenPuffers pH 11. Als Leerwert diente Normalharn.

Uhrzeit	Extinktionen	Mittelwert	x ml	Alizarin pro	in %
		= E		Ansatz ml	Gesamt
13	0,298 0,296	0,297	10	8,5	108 1513
15	0,260 0,260	0,260	10	7,44	94,4 1415
17	0,207 0,215	0,211	10	6,04	76,5 2220
19	0,248 0,250	0,249	10	7,12	90,4 1718
21	0,161 0,161	0,161	10	4,6	58,4 1400
23	0,294 0,292	0,293	5	8,39	64,5 1228
		insgesamt nach 12 Stunden			9494
11	0,234 0,228	0,231	5	6,6	50,8 2440
		insgesamt nach 24 Stunden			11934

Da 115,2 mg Alizarin verfüttert wurden, sind nach 12 Stunden im Harn 8,2% und nach 24 Stunden 10,4% wiedergefunden worden.

3) Alizarinbestimmung im Harn nach Ruberythrinsäuregabe
Versuchsanordnung wie unter 2).

Uhrzeit	Extinktionen		Mittelwert	x ml	Alizarin in γ pro		
					Ansatz ml	Gesamt	
			= E				
13	0,128	0,128	0,128	5	3,66	28,2	704
15	0,155	0,157	0,156	10	4,46	56,7	907
17	0,153	0,159	0,156	10	56,7	56,7	1700
19	0,231	0,235	0,233	10	6,67	84,6	1439
21	0,167	0,167	0,167	10	4,77	60,5	1511
23	0,264	0,270	0,267	5	7,65	58,9	884
			insgesamt nach 12 Stunden				7145
11	0,222	0,216	0,219	5	6,28	47,9	1870
			insgesamt nach 24 Stunden				9015

Da insgesamt eine Menge von 115,2 mg Alizarin als Ruberythrinsäure verfüttert wurde, sind nach 12 Stunden 6,2% und nach 24 Stunden 7,8% wiedergefunden worden.

4) Glucuronsäurebestimmung im Harn

1 ml Harn und x ml Verdünnung (Aqua dest.), davon je 1 ml zur Glucuronsäurebestimmung.

a) Kontrollgruppe

Uhrzeit	Extinktionen		Mittelwert	x ml	Glucuronsäure in $\text{pro } \gamma$		
					Ansatz ml	Gesamt	
			= E				
11	0,431	0,429	0,430	5	65,2	391	1568
13	0,285	0,285	0,285	5	43,1	259	4650
15	0,460	0,464	0,462	4	70,0	350	4550
17	0,238	0,242	0,240	3	46,3	185	6280
19	0,511	0,509	0,510	3	77,4	310	4330
21	0,240	0,242	0,241	3	36,5	146	2920
23	0,400	0,400	0,400	3	60,6	242	4210
			insgesamt nach 12 Stunden				28418
11	0,234	0,247	0,245	10	37,1	408	18350
			insgesamt nach 24 Stunden				46768

b) nach Gabe von Alizarin

Uhrzeit	Extinktionen		Mittelwert	xml	Glucuronsäure in γ pro		
			= E		Ansatz	ml	Gesamt
11	0,349	0,351	0,350	5	53,0	318	1420
13	0,250	0,250	0,250	10	37,9	417	5850
15	0,277	0,279	0,278	8	57,3	515	7740
17	0,238	0,242	0,240	6	36,4	255	8130
19	0,349	0,351	0,350	5	53,1	318	6050
21	0,234	0,234	0,234	5	35,5	212	5110
23	0,285	0,293	0,289	5	43,8	263	4990

Glucuronsäureausscheidung in 12 Stunden 39310

11	0,300	0,302	0,301	10	45,6	502	24000
----	-------	-------	-------	----	------	-----	-------

Glucuronsäureausscheidung in 24 Stunden 6 63310 γ

Die Mehrausscheidung an Glucuronsäure nach oraler Gabe von Alizarin in 12 Stunden gegenüber der Kontrollgruppe beträgt 10 892 γ .

c) nach Verfütterung von Ruberythrinsäure

Uhrzeit	Extinktionen		Mittelwert	xml	Glucuronsäure in γ pro		
			= E		Ansatz	ml	Gesamt
11	0,624	0,616	0,620	5	94,0	563	1970
13	0,206	0,206	0,206	10	31,2	344	6530
15	0,284	0,286	0,285	8	43,2	389	6220
17	0,246	0,240	0,243	6	36,8	257	7715
19	0,401	0,399	0,400	5	60,6	364	6180
21	0,212	0,212	0,212	5	32,1	192	4810
23	0,233	0,237	0,235	5	35,6	214	3200

Glucuronsäureausscheidung in 12 Stunden 35925 γ

11	0,277	0,277	0,277	10	42,0	462	18000
----	-------	-------	-------	----	------	-----	-------

Glucuronsäureausscheidung in 24 Stunden 53925 γ

Die Mehrausscheidung an Glucuronsäure nach oraler Gabe von Ruberythrinsäure innerhalb von 12 Stunden beträgt somit 7507 γ gegenüber der Kontrollgruppe.

IV. CALCIUMOXALATKRISTALLISATIONSVERSUCH

1) Kontrolle mit Aqua tridest.

Ansatz	1	Titriplex	Mittelwert	Leerwert	Differenz	γ Calcium im Niederschlag
			= E	in μ l	in μ l	
1	88	92	90	23	67	134
2	91	94	92,5	23	69,5	139
3	93	105	99	23	76	152
4	98	105	100,5	23	77	154
5	99	115	107	23	84	168
6	101	109	105	23	82	164

2) Ansatz mit Alizarin glucuronid

Ansatz	1	Titriplex	Mittelwert	Leerwert	Differenz	γ Calcium im Niederschlag
			= E	in μ l	in μ l	
1	63	64	63,5	23	40,5	81
2	69	71	70	23	47	94
3	75	78	76,5	23	53,5	107
4	81	90	85,5	23	62,5	125
5	88	90	89	23	66	132
6	91	96	93,5	23	70,5	141

3) Ansatz mit der Fraktion II

Ansatz	1	Titriplex	Mittelwert	Leerwert	Differenz	γ Calcium im Niederschlag
			= E	in μ l	in μ l	
1	70	78	74	19	55	110
2	87	90	88,5	19	69,5	139
3	86	91	88,5	19	69,5	139
4	90	100	95	19	76	152
5	94	101	97,5	19	78,5	157
6	94	97	95,5	19	76,5	153

Umrechnung von 1 Titriplex auf Calcium :

1 ml m/400 titriplex entspricht 0,1002 mg Calcium. 1 μ l entspricht demnach 0,1002 γ Calcium. Von dem Gesamtlösungsvolumen des Niederschlages von 10 ml wurden nur 0,5 ml in die Bestimmung eingesetzt. Die in der Differenz verbrauchten μ l Titriplexlösung muß man mit 2 multiplizieren , um γ Calcium zu erhalten.

LITERATUR

1. DULCE, H.-J. : persönliche Mitteilung
2. MADAUS, G., KOCH, E. : Z. exper. Med 109, 517, (1941)
3. KELLER, J., GÖRLICH, B. : Z.Urol. 0944, 1
4. BAUER, A. : Z.Urol. 14, 174, (1920)
5. BAUER, A. : Z.Urol. 17, 274, (1923)
6. SCHMIEDEBERG, O., MEYER, H. : Z.physiol. Chem. 3, 422 (1879)
7. HAIS, I.M. : Handbuch der Papierchromatographie, VEB
Gustav Fischer Verlag, Jena, 1965, Band I
Seite 329
8. BODE, E. : Inauguraldissertation , Berlin 1961
9. BURNS, J. : Am. J. of Med. XXVI, Nr.5 , 740, (1959)
10. RICHTER : zitiert nach MADAUS
11. DISCHE, Z. : J.biol.Chem. 167, 191, (1947)
12. SIEGMUND, P., DULCE, H.-J. : Hoppe-Seyler Z. Physiol
Chem. 320, 149, (1960).

Für die Möglichkeit an dem Institut für
Angewandte Physiologische Chemie und
Klinische Chemie an meiner Dissertation
zu arbeiten und für die mir dabei
erwiesene Hilfe danke ich Herrn Professor
Dr. med H.-J. D u l c e recht herzlich.

LEBENS LAUF

Am 30.8.1940 wurde ich als viertes Kind des Dipl.-Ing. Karl Mähner und seiner Ehefrau Johanna geb. Gruber in Berlin-Spandau geboren.

1946 wurde ich in die 20. Volksschule in Berlin-Spandau eingeschult, auf der ich bis zum Wechsel auf das Kant-Gymnasium im Jahre 1952 blieb. Als Austauschschüler des Kant-Gymnasiums besuchte ich ab August 1956 für ein Jahr die Abington Senior High School in Abington, Pennsylvania, USA.

1959 bestand ich am Kant-Gymnasium das Abitur, und begann im Sommersemester 1959 an der Freien Universität Berlin das Medizinstudium. Die medizinische Vorprüfung bestand ich in Berlin im Herbst 1961.

Im Februar 1965 legte ich an der Freien Universität Berlin das medizinische Staatsexamen ab, und begann meine Medizinalassistentenzeit im Mai 1965.

In den ersten zehn Monaten der Medizinalassistentenzeit arbeitete ich bei Herrn Professor Dr. med. H.-J. Dulce im Institut für Angewandte Physiologische Chemie und Klinische Chemie an der Beendigung der Doktorarbeit.

Die restliche Medizinalassistentenzeit arbeitete ich auf den vorgeschriebenen Abteilungen im Städtischen Krankenhaus Spandau Lynarstraße. Am 31.4.1967 erhielt ich die Approbation als Arzt. Zur Zeit bin ich im Strahleninstitut des Städtischen Krankenhauses Spandau Lynarstraße bei Herrn Professor Dr. Schlungbaum tätig.

Seit 1962 bin ich verheiratet und habe eine fünfjährige Tochter.

